

Digestion de protéines dans le gel par la trypsine

Ce protocole a fait l'objet d'optimisations et est actuellement utilisé en routine au sein de la plateforme de spectrométrie de masse et protéomique de l'IBPS, UPMC.

Précautions

- Travailler avec des gants, une blouse et une charlotte pour éviter les contaminations (kératine).
- Eviter les shampoings à la kératine et les pulls en laine.
- Bien nettoyer toutes les surfaces, paillasse etc... avec de l'éthanol.
- Utiliser des tubes Eppendorf de préférence traités anti-adsorption.
- Ouvrir les tubes Eppendorf de préférence avec les deux mains (Une main pour tenir le tube et l'autre pour l'ouvrir).

Matériel

Il est souvent préférable et plus facile de travailler avec des aliquots préalablement préparés et conservés à -20°C , pour des raisons de reproductibilité et pour éviter les contaminations des solutions stocks.

- Stock de **DTT** en solution dans H_2O , conservés à -20°C , aliquots de $5\mu\text{L}$ à 1M .
- Stock de **tampon de bicarbonate d'ammonium NH_4HCO_3** conservé à -20°C , aliquots de 1mL à 100mM .
- Stock de **d'iodoacétamide (IAA)** dans des tubes opaques, protégés de la lumière, aliquots en poudre en quantité variable, conservés à -20°C .
- Stock de **trypsine Gold mass spectrometry grade PROMEGA**, en solution dans une solution de HCl à 0.01M (pour éviter l'autolyse éventuelle de la trypsine), aliquots de $5\mu\text{L}$ à $0.1\mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$, conservés à -20°C .

Protocole

1) Excision des bandes de gel 1D avec un scalpel, gel 2D avec un emporte pièce.

Travailler sur une surface plane et bien éclairée, de préférence du verre nettoyé à l'éthanol. Bien nettoyer le scalpel à l'éthanol entre le découpage de différentes bandes de gel. Découper les bandes le plus précisément possible en minimisant au maximum la quantité de gel non coloré. Les placer dans des tubes Eppendorf bien numérotés.

2) Découper ensuite les bandes de gel 1D dans les tubes Eppendorf ou sur une plaque de verre bien nettoyée

(attention de ne pas rayer les parois des tubes avec le scalpel pour ne pas introduire de polymères dans les échantillons). Découper en petits cubes de environ 1 mm^3 , suffisamment petits pour optimiser la pénétration de la trypsine dans les mailles du gel et suffisamment gros pour ne pas les aspirer dans le cône de la pipette lors des diverses étapes de la digestion.

3) Lavages des morceaux de gels pour éliminer le bleu de Coomassie (Colloidal Coomassie blue G-250 <http://www.sigmaaldrich.com>) et le SDS qui inhibe l'activité de la trypsine.

- 2x lavages (ajouter un volume correspondant à environ 5 fois le volume du gel) avec H₂O/ACN 1/1 pendant 15 min, sous agitation, à température ambiante. Retirer le mélange H₂O/ACN à la pipette.
- 1x lavage avec ACN, pendant 10 min, sous agitation, à température ambiante (les fragments de gels se déshydratent, ils deviennent blancs et forment une boule compacte). Retirer l'ACN à la pipette.

4) Réduction des ponts disulfures au DTT 10 mM

- Préparer la solution de DTT à 10mM par ajout de 500µL de tampon NH₄HCO₃ 100mM dans le tube Eppendorf stock contenant 5µL de DTT 1M.
- Ajouter un volume de solution DTT 10mM tel que le gel soit juste recouvert.
- Incuber 45 min à 56°C, au bain marie.

5) Alkylation des cystéines à l'iodoacétamide (IAA : I-CH₂-CO-NH₂, MM=184.9)

- Après réduction à 56°C, placer les tubes à température ambiante pour limiter le nombre d'adduits avec l'IAA.
- Pendant ce temps préparer la solution d'IAA à 100mM, dans du tampon NH₄HCO₃ 50mM (ex : dans un tube Eppendorf contenant 3,6mg d'IAA en poudre, conservé à -20°C, ajouter 195 µL de tampon NH₄HCO₃ 50mM sachant MM_{IAA} = 184g.mol⁻¹).
- Enlever l'excès de solution avec la pipette et le remplacer par la solution d'IAA préparée extemporanément, de façon à recouvrir les morceaux de gel.
- Incuber à température ambiante, dans le noir (pour limiter le nombre d'adduits avec l'IAA) pendant 30 min.
- Puis, retirer la solution d'IAA en excès.

6) Répéter les lavages comme en 3) afin d'éliminer le DTT et l'IAA en excès.

- 2x lavage (ajouter un volume correspondant à 5 fois le volume du gel) avec H₂O/ACN 1/1 pendant 15 min, sous agitation, à température ambiante. Retirer le mélange H₂O/ACN à la pipette.
- 1x lavage avec ACN, pendant 10 min, sous agitation, à température ambiante (les fragments de gel se déshydratent, deviennent blancs et forment une boule compacte, ce qui va favoriser ensuite l'entrée de la trypsine par réhydratation des morceaux de gel). Retirer l'ACN à la pipette.

7) Digestion par la trypsine

- Préparer la solution de trypsine dans du tampon NH_4HCO_3 50mM à une concentration en trypsine de environ $8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (Se placer dans la glace pour limiter la réaction d'autolyse de la trypsine).
Ex : ajouter 60 μL de tampon NH_4HCO_3 50mM dans 1 aliquot de 5 μL de trypsine à $0.1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ conservé à -20°C .
- Toujours dans la glace, réhydrater le gel dans le tampon de digestion NH_4HCO_3 50mM contenant la trypsine à $8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, de sorte que les morceaux de gel soient juste recouverts. Ne pas mettre trop de trypsine sinon, les pics correspondant à l'autolyse de la trypsine deviennent majoritaires dans les spectres de masse, au détriment de pics intéressants pour l'identification des protéines.
Incuber dans la glace pendant 45 min, afin de laisser le temps à la trypsine de bien diffuser à l'intérieur du maillage serré de polyacrylamide du gel tout en minimisant l'autophagie.
- Après 45 min, éliminer le tampon de digestion qui n'est pas rentré dans le gel et le remplacer par 20 μL de tampon NH_4HCO_3 50mM ne contenant pas de trypsine (En réalité, il faut recouvrir les fragments de gel, afin que la digestion ne se fasse pas sans tampon pendant la nuit, en règle générale, le volume de tampon doit être le plus faible possible afin de ne pas trop diluer les peptides issus de la digestion).
- Incubation des échantillons bien fermés, dans une étuve à 37°C O/N.

8) Arrêt de la digestion tryptique

- Après digestion, les échantillons sont donc placés à température ambiante et centrifugés pour récupérer le surnageant condensé sur les parois des tubes.
- Le surnageant de chaque tube (environ 20 μL) est transvasé dans un nouveau tube Eppendorf. Acidifier les échantillons dans 10 % acide formique.
- Placer ensuite les échantillons à 4°C si l'analyse par spectrométrie de masse est réalisée dans la foulée, ou à -20°C sinon.

N.B. : Dans la plupart des protocoles de digestions sur gel, une extraction des peptides du gel est ensuite effectuée. De nombreux exemples montrent que cette extraction n'est pas nécessaire et que 80% des peptides issus de la digestion se trouvent déjà par simple diffusion, dans le surnageant. De plus, l'extraction peut aussi conduire à la contamination des échantillons par des polymères issus du gel de polyacrylamide, ce qui peut s'avérer très ennuyeux pour des échantillons analysés par nanoLC-ESI (colonne bouchée).